การโคลนยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่างและการแสดงออกของยีนในยาสูบ

Cloning of Cyclophilin Gene from *Sorghum bicolor* (L.) Moench and Gene Expression in Tobacco

สุภาวดี ง้อเหรียญ[1/] กษิดิศ ดิษฐบรรจง[1/] ชยานิจ ดิษฐบรรจง[1/]
พยุงศักดิ์ รวยอารี[1/] หทัยรัตน์ อุไรรงค์[1/]
Suphawadee Ngorian[1/] Karsedis Distabanjong[1/] Chayanit Distabanjong[1/]
Payungsak Rauyaree[1/] Hathairat Urairong[1/]

ABSTRACT

Cyclophilins are ubiquitous proteins present in all subcellular compartments, which are involved in a variety of processes such as immunosuppression and major biotic and abiotic stresses. The research work has been done at the Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathumthani Province during October 2007 – September 2010. In this study, full-length genomic DNA sequences of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) encoding cyclophillin (*Sb*CyP) have been isolated from sorghum via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 1062 kb, including a 519 bp complete ORF, the 5'UTR of 130 bp, 3'UTR of 413 bp and a polyA signal AATAA motif. *Sb*CyP gene encoding the 172 amino acid polypeptide. Conducted submit CyP genes on GenBank accession no. EU722309. The highly conserved region of the gene is cyclophilin (CyP) which are also found in *Saccharum officinarum* L. (QG246462.1) and *Zea mays* L. (X68678.1) with 91% and 90% of homology respectively. A 519 bp fragment of the *Sb*CyP gene was inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator, nptII as selectable marker with total size of 10 kb for pCAMBIA2300 – CyP over – expression cassette. Maximum quantity of protein produced from recombinant plasmid (pEcoli – CyP) was detected after 6 hours of activation induction by IPTG. In addition, examination by SDS – PAGE displayed the 18.4 kDa of protein size. The expression cassette was then transformed into *Nicotiana tobacum* (tobacco) plant by Agrobacterium – mediated transformation, with kanamycin as a selection antibiotic. Ten transgenic tobacco plants were obtained using PCR – based method. Investigation of stress to tolerance involved salinity tolerance and drought tolerance, using NaCl and PEG 6000 respectively. Transgenic tobacco plants displayed higher tolerance to these stress conditions compare to non – transgenic plants.

Key words : Cyclophilin Gene, *Soghum bicolor* (L.) Moench, Cloning and Charterization, Transformation, *Nicotiana tobacum* (Tobacco) Plant

---

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathumthani 12110

บทคัดย่อ

การโคลนยีนไซโคลฟิลิน (Cyclophilin : CyP) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2553 งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่าง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน CyP นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่าง ได้ยีนขนาด 1062 คู่เบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อย (QG246462.1) และข้าวโพด (X68678.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identities) เท่ากับ 91% และ 90% ตามลำดับ นำข้อมูลมาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่า ยีน CyP มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (ORF) มีขนาด 519 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน CyP จำนวน 172 amino acid พบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5′ (5′UTR) และ 3′ (3′UTR) ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน เท่ากับ 130 และ 143 คู่เบส ตามลำดับ และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งของ polyA signal (AATAA motif) อยู่ในส่วนของ 3′UTR ได้ทำการ submit ยีน CyP ลงในฐานข้อมูลชีวภาพสากล GenBank accession no. EU722309 ทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อยีน CyP เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม (pCAMBIA2300 – CyP) มีขนาด 10 กิโลเบส ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ recombinant plasmid (pEcoli – CyP) พบว่า มีการแสดงออกของยีน CyP หลังจากถูกกระตุ้นด้วย IPTG มีปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้สูงสุดเมื่อถูกกระตุ้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และพบการแสดงออกของโปรตีนที่ขนาด 18.4 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วย SDS – PAGE ทำการถ่ายฝากยีน CyP เข้าสู่ใบยาสูบโดยใช้วิธีอะโกรแบคทีเรีย คัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin และตรวจสอบการปรากฏของยีนโดยใช้เทคนิค PCR พบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 10 ต้น ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทดสอบความทนทานต่อสภาวะเครียด ได้แก่ การทดสอบในอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) เพื่อทดสอบความทนเค็ม และทดสอบในอาหารสูตร MS ที่เติม PEG 6000 เพื่อทดสอบความทนสภาวะขาดน้ำ พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มีความทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้ดีกว่าต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน CyP ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

คำหลัก : ยีนไซโคลฟิลิน, ข้าวฟ่าง, การโคลนและวิเคราะห์ยีน, การถ่ายฝากยีน, ยาสูบ

คำนำ

ปัจจุบันประชากรส่วนใหญ่ในทุกภาคของประเทศไทย ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก พืชส่วนใหญ่ที่เกษตรกรทำการเพาะปลูกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าวโพด ปาล์มน้ำมัน ยางพารา ถั่วเหลือง มันสำปะหลัง อ้อย เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) การเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจเหล่านี้มักพบปัญหาและอุปสรรคในการเพาะปลูก เช่น โรคพืช แมลงศัตรูพืช และสภาพความแปรปรวนของดินฟ้าอากาศ ทั้งปรากฏการณ์เอลนินโญที่ทำให้เกิดความแห้งแล้ง ในขณะที่ลานินญาทำให้เกิดฝนตกหนักในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเอลนินโญและลานินญาส่งผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรมโดยตรง (จารุจินต์, 2554) ปัจจุบันปัญหาดังกล่าวนับวันจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ทำให้เกษตรกรต้องปรับปรุงวิธีการเพาะปลูก รวมทั้งวางแผนการเพาะปลูกให้เหมาะสมกับสภาพดินฟ้าอากาศ นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีพันธุ์พืชที่มีคุณสมบัติสามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ การนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยพัฒนาพันธุ์พืชของไทยให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตที่สูงขึ้น สามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ จึงเป็นเรื่องที่นักวิจัยไทยต้องทำการวิจัยอย่างเร่งด่วน

ไซโคลฟิลิน (CyPs) เป็นโปรตีนประเภท เปปติดิลโพรพิล ซิส-ทรานส์ ไอโซเมอเรส (PPIases) ที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ของออร์แกนเนล (organelle) ทั้งในเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต มีการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่พืชชนิดนั้นดำรงชีวิตอยู่ เช่น การได้รับผลกระทบจากโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ เช่น สภาวะแห้งแล้ง สภาวะดินเค็ม เป็นต้น จากการศึกษาพบว่า ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มียีนชนิดหนึ่งที่สามารถตอบสนองต่อสภาวะความไม่เหมาะสมด้านต่างๆ คือ ยีนไซโคลฟิลิน โดยมีการสร้างภูมิคุ้มกัน และยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ซึ่งช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ (Luan *et al*., 1994; Kong *et al*., 2001) ไซโคลฟิลินในพืช ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1990 โดยการสกัดแยก cDNA จากมะเขือเทศ ข้าวโพด และคาโนลา (Gasser *et al*., 1990) ปัจจุบันมีรายงานพบลำดับเบสที่เหมือนกับยีนไซโคลฟิลินที่โคลนได้จากพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง อ้อย ถั่วเหลือง ฝ้าย ยาสูบ มะพร้าว และอะราบิดอพซิส เป็นต้น อีกทั้งยังพบยีนชนิดนี้ในมนุษย์และสัตว์อีกด้วย ที่ผ่านมามีงานวิจัยการค้นหายีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะของการทนแล้งในข้าวฟ่าง และพบว่ามียีนไซโคลฟิลินที่มีการแสดงออกอย่างสูงเมื่อปลูกในสภาพแล้ง อีกทั้งยังพบไซโคลฟิลินมีการแสดงออกอย่างสูงในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ จากพืชชนิดอื่นด้วย เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง พืชตระกูลถั่ว คาโนลา และมันฝรั่ง (Marivet *et al*.,1992, 1994, 1995; Godoy *et al*., 2000; Sharma and Singh, 2003) เป็นต้น

ดังนั้น การโคลนยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่างสายพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ยางพารา ถั่วเหลือง อ้อย และพืชอื่นๆ โดยการถ่ายฝากยีนไซโคลฟิลินเข้าสู่พืชเหล่านั้น เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณสมบัติทนแล้งมากยิ่งขึ้น จากยีนที่สามารถพัฒนาขึ้นได้เองในประเทศไทยจะเป็นประโยชน์ต่อการนำพืชทนแล้งที่ได้มาพัฒนาให้สามารถใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ข้าวฟ่าง 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 1 (UT 1) และ พันธุ์สุพรรณบุรี 60 (SPR 60)
2. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์และตรวจวิเคราะห์ยีน Cyclophilin (CyP) ได้แก่ CyP4 (forward) + CyP4 (reverse), CyPXbaI (forward) + CyPKpnI (reverse), NOS (forward) + 35SCaMV (reverse), CyP*Sal* (forward) + CyP*Hd* (reverse), และ T7_Up1 (forward) + T7_term (reverse)
3. Plant expression vector (pCAMBIA2300 จาก ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, ม. เกษตรศาสตร์)
4. เครื่อง Spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700)
6. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
7. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
8. อุปกรณ์การอ่านภาพ และบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์
9. เครื่องมือในการวิเคราะห์ผลแบบ Image Analyzer พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ผล
10. ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร
11. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (Genomic DNA Extraction Mini Kit) ของ RBC Bioscience
12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis, Molecular Weight Marker และProtein Marker
13. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR Amplification)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของ QIAGEN
15. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน (T&A Cloning Kit) ของ RBC Bioscience
16. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas
17. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α และ BL21 (DE3) competent bacteria (EMD Biosiences, Inc.)
18. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
19. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ LB (Luria – Bertani) และ antibiotic (ampicillin และ kanamycin)
20. Protein Expression vector (pEcoli Expression System) ของ Clontech

21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จากเว็บไซต์ http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
    - โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
    - โปรแกรม CromasPro version 1.33 จากเว็บไซต์ http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html
    - โปรแกรม NEBcutter2 จาก http://tools.neb.com/NEBcutter2/
22. เครื่องมือที่ใช้สำหรับงานถ่ายยีน Electroporator Gene Pulser® II Capacitance extender Plus (Bio-RAD) และ Electroporation cuvette ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
23. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน
24. อะโกรแบคทีเรียม (*A. tumefaciens*) สายพันธุ์ (strain) EHA 105

วิธีการทดลอง

1. การโคลนยีน CyP จากข้าวฟ่าง

1.1 ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีน CyP ที่มีการแสดงออก

ทำการศึกษา และค้นหายีน CyP ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์หาลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน CyP ได้ดังนี้คือ CyP4 (forward) และ CyP4 (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีนในส่วนที่มีการแสดงออก คือ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน CyP เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ยีนเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน คือ CyP*Sal*I (forward) และ CyP*Hd* (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้การตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีน CyP เข้ากับ protein expression vector (pEcoli) คือ T7_Up1 (forward) และ T7_term (reverse) (Table 1.)

1.2 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ

คัดเลือกพันธุ์ข้าวฟ่างที่มีลักษณะทนแล้ง จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 1 และพันธุ์สุพรรณบุรี 60 นำเมล็ดพันธุ์มาเพาะในกระถาง เมื่ออายุได้ 1 เดือน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตัดใบอ่อนของข้าวฟ่างประมาณ 50 – 100 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge

tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP1 buffer หรือ GPX1 buffer 400 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที เติม GP2 buffer 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 นาที วาง Filter column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน Filter column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ทิ้ง Filter column และย้ายน้ำใสลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP3 buffer 750 ไมโครลิตร (1.5 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 5 วินาที วาง GD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube และเก็บ GD column ไว้ (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อีกครั้ง นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube) เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง เติม Wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อีกครั้ง นาน 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง) ย้าย GD column ที่แห้งแล้วลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Preheat Elution buffer 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ Column matrix ทิ้งไว้นาน 3 – 5 นาที จนกระทั่ง Elution buffer ถูกดูดซับโดย matrix ได้มากที่สุด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ นำไปวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Optical Density : OD) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris – EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

1.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอข้าวฟ่างที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyP คือ CyP4 (forward) และ CyP4 (reverse) โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μM gene specific primer (forward), 0.4 μM gene specific primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre – Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 60°C 30 วินาที, Extension 70°C 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, Lithuania) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

1.4 การโคลนยีน CyP เข้าสู่เวกเตอร์ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP

1.4.1 การโคลนยีน CyP เข้าสู่เวกเตอร์

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ตามคำแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel ย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาด 1 กิโลเบส ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม QG buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าทุกๆ 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันย้ายสารละลายใส่ใน binding column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย binding column วางลงบนหลอดทดลอง เติม EB buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 – 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตร ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย gel – purified PCR product 4 ไมโครลิตร, T&A cloning vector 2 ไมโครลิตร, ligation buffer A 1 ไมโครลิตร, ligation buffer B 1 ไมโครลิตร, T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 22°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด competent cell 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 – 45 วินาที แช่บนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติม Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) – amplicilin/X-gal/IPTG [(LB : เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม tryptone, 5 กรัม yeast extract, 15 กรัม bacto-agar, ddH_2O), 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร amplicilin, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร IPTG, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร X-gal] บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicilin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12 – 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย resuspension solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม lysis solution 250 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม neutralization solution 350 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 5 นาที ย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม wash solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอดทดลองเติม elution buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

1.4.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Bam*HI ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที ตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

1.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน CyP นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน CyP มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5’ – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3’ และ M13 (reverse) 5’ – GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3’ ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, ready reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 μM ไพรเมอร์ forward/reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denature 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extension 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) ล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร : 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที กลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 0°C นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 300 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด ละลายตะกอนด้วย HiDi - formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ใส่ตัวอย่างลงในหลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่ การเปรียบเทียบชนิดยีนกับพืชที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยวิเคราะห์เป็นค่าความเหมือน (% Max Identity) การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ (amino acid) การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับพืชชนิดต่างๆ และการวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

2. การสร้างชุด Cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

2.1 การสร้างชุด Cassette ยีน

2.1.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอของข้าวฟ่างที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyP ที่ออกแบบไว้จำนวน 1 คู่ ได้แก่ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μM Gene Specific Primer (Forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (Reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 70°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่าง ไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้น ดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators พร้อมบันทึกภาพ

2.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน CyP เข้ากับ Plant Expresstion Vector

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) มีขนาด 9648 คู่เบส มาใช้เป็น plant expression vector มียีน nptII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน CyP/พลาสมิดดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest buffer, 1U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.4.1) จะได้ชิ้นพลาสมิด pCAMBIA2300 และชิ้นยีน CyP โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *Kpn*I นำชิ้นยีน CyP เชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิดสายผสมที่สมบูรณ์ pCAMBIA2300 – CyP ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP 100 – 200 นาโนกรัม, pCAMBIA2300 50 – 400 นาโนกรัม, 1X ligation buffer, T4 DNA ligase, ปรับปริมาตรด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat – shock (Sambrook *et al*., 1989) และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB – ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน

2.2.1 การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) ทำการตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Kpn*I ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme, ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker

2.2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการปรากฏของยีน ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, 2U Hot Taq Master Mix, 0.5 μM primer (forward), 0.5 μM primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre – Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 60°C 30 วินาที, Extension 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน (protein expression)

3.1 การสร้างชุด Cassette ยีน

3.1.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอของข้าวฟ่างที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyP ที่ออกแบบไว้จำนวน 1 คู่ ได้แก่ CyP*Sal*I (forward) และ CyP*Hd* (reverse) (Table 1.) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I และ *Hind*III เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μM Gene Specific Primer (Forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (Reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre – Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 70°C

1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

3.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน CyP เข้ากับ Protein Expression Vector

นำดีเอ็นเอของ expression vector (pEcoli) ที่มีขนาด 5758 คู่เบส ซึ่งอยู่ในส่วนของ N – terminal vector ในระบบ T7 expression system มี T7 promoter เป็นส่วนประกอบทำให้เกิดการถอดรหัสและแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ และชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I และ *Hind*III โดยในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน CyP/ดีเอ็นเอของเวกเตอร์ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest Buffer, 1U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex, USA) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators และแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.4.1) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส และชิ้นดีเอ็นเอของเวกเตอร์ โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *Hind*III จากนั้นเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ expression vector เพื่อสร้าง recombinant protein มีขนาดประมาณ 6.3 กิโลเบส ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP 100 – 200 นาโนกรัม, pEcoli vector 50 – 400 นาโนกรัม, 1X Ligation Buffer, T4 DNA ligase, ปรับปริมาตรด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat – shock และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB – ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน

3.2.1 การตรวจสอบการปรากฏของยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) ทำการตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I และ *Hind*III ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme, ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker

3.2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7_Up1 (forward) + T7_term (reverse) ใช้ตรวจสอบโปรตีนสายผสม pEcoli – CyP ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, 2U Hot Taq Master Mix, 0.5 μM Primer (forward), 0.5 μM Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre – Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

3.3 การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม (pEcoli – CyP) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย BL21 (DE3) เพื่อการผลิตโปรตีน

นำพลาสมิดดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสม (pEcoli – CyP) ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไป spread บนอาหารแข็ง LB – Ampicillin ที่เตรียมไว้ บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องในการถ่ายฝากยีนด้วยเทคนิค PCR (ข้อ 3.2.2)

3.4 การตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน CyP

นำเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant plasmid ของยีน CyP มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB – ampicillin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูด cell culture ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB – ampicillin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 50 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง OD_{600} = 0.5 จากนั้นเติม isopropyl – β – D – thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3 mM เลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยเก็บเซลล์ทุก 2 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารโดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำมาแยกขนาดของ fusion protein ด้วย 10% SDS – PAGE ใช้บัฟเฟอร์ Tris – glycine (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1% SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ

2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมสีด้วยสารละลาย Coomassie – blue (0.2% Coomassie – blue R – 250 ใน 50% methanol และ 70% acetic acid) เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย destain solution (25% methanol, 7% acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทียบขนาดของแถบโปรตีน CyP กับโปรตีนมาตรฐาน PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Lithuania) เพื่อตรวจดูปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง (Biolabs, 1993)

4. การถ่ายยีน CyP เข้าสู่ยาสูบ

4.1 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด (chimeric construct) เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี Electroporation (Walkerpeach และ Velten, 1994)

4.1.1 การเตรียม competent cell

นำเชื้อ *A. tumefaciens* มาเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast Extract Peptone (YEP) (ปริมาตร 1 ลิตร : bacto-peptone 10 กรัม, yeast extract 10 กรัม, NaCl 5 กรัม, agar 1.5%) ผสมสาร rifampicin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YEP – rifampicin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลาประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง จนค่า OD_{600} = 0.2 – 0.3 นำเชื้อที่ได้แช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 – 30 นาที นำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ จำนวน 3 รอบ ด้วย 10% glycerol (ที่แช่เย็น) ปริมาตร 100 20 และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ รอบสุดท้ายละลายตะกอนเซลล์แล้วแบ่ง competent cell ที่เตรียมได้ใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลอด เก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ -80°C

4.1.2 การเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี Electroporation

นำ competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80°C มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำพลาสมิด pCAMBIA2300 - CyP Gene ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใส่ลงในหลอด competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 – 30 นาที นำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงใน cuvette ขนาด 0.2 เซนติเมตร เคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยใช้สภาวะตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Bio-Rad Gene Pulser) ดังนี้ cuvette gap 0.2 cm, voltage 2.5 kV, capacitor 25 μF และ resistance 480 Ω ก่อน pulse เช็ด cuvette ให้แห้งอย่าให้มีฟองอากาศ หลัง pulse เติมอาหารเหลว YEP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ย้ายส่วนผสมลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าที่ความเร็ว 200 – 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาตร 200 ไมโครลิตร Spread plate บนอาหารแข็ง YEP – rifampicin (control) และบนอาหารแข็ง YEP – rifampicin – kanamycin เพลทละ 80 ไมโครลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 2 – 3 วัน ตรวจสอบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.3 การตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์ *A. tumefaciens* โดยเทคนิค PCR

นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, 2U Hot Taq Master Mix, 0.5 µM primer (forward), 0.5 µM primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre – denature 95°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 60°C 30 วินาที, Extension 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (∝) หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

4.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium*-mediated gene transfer) ดัดแปลงจากวิธีการของ Horsch และคณะ (1985)

4.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนยาสูบเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

นำเมล็ดยาสูบเวอร์จิเนียมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Haiter® Bleach ความเข้มข้น 30% (v/v) นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 3 – 4 ครั้ง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 ในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จนเมล็ดงอก และเจริญเติบโตเพื่อนำใบยาสูบมาใช้ในการถ่ายยีน

4.2.2 การเตรียมเซลล์ *A. tumefaciens*

นำเซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มียีน CyP มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2x Yeast extract and Tryptone (2xYT) (ปริมาตร 1 ลิตร : bacto-tryptone 16 กรัม, yeast extract 10 กรัม, NaCl 10 กรัม, agar 1.5%, pH 7.5) เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin (50 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 2 – 3 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT – kanamycin ที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 – 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความเข้มข้นที่ OD_{600} ประมาณ 0.5 – 1.0 ซึ่งเป็น log phase จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ เทลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทอาหารเหลวในหลอดทิ้ง จากนั้นทำการล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ จำนวน 3 ครั้ง โดยเติมอาหารเหลว MS + BA 5 µM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมไว้สำหรับใช้ในการถ่ายยีน

4.2.3 การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบ โดยวิธี leaf disc transformation ดัดแปลงจากวิธีการของ Horsch และคณะ (1985)

นำเซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มียีน CyP มาเลี้ยงร่วมกับใบยาสูบโดยตัดใบยาสูบให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. นำไปจุ่มในอาหารเหลว MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* เจือจาง 1 : 20 เป็นเวลา 1 นาที แล้วผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง Whatman no.1 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + BA 5 µM + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 ในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำใบยาสูบไปเลี้ยงบนอาหาร MS + BA 5 µM + carbenicillin 400 มิลลิกรัม/ลิตร + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 นาน 6 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7 วัน เพื่อทำการฆ่าเซลล์ *A. tumefaciens* หลังจากนั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปอีก 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตรเดิมที่ลดปริมาณ carbenicillin ลงเหลือ 200 มิลลิกรัม/ลิตร และเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน เพื่อให้ใบยาสูบมีการพัฒนาเจริญเติบโตเป็นยอดอ่อน

4.2.4 การคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน

ทำการย้ายชิ้นส่วนของยอดอ่อนมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม kanamycin (200 มิลลิกรัม/ลิตร)+ BA 5 µM + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 นาน 2 สัปดาห์ คัดเลือกยอดอ่อนที่รอดชีวิต ย้ายลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณยอด เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์

4.2.5 การชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์

ทำการตัดแยกยอดอ่อนที่เจริญเติบโตไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 5 µM + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เพื่อชักนำให้เกิดราก และนำต้นที่ได้จากการถ่ายยีนมาตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

5. การตรวจสอบการปรากฏของยีน โดยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอเนื้อเยื่อต้นอ่อนยาสูบที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกในอาหารคัดเลือก จากส่วนใบ ยอด ลำต้น หรือราก ประมาณ 0.1 – 0.3 กรัม โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) (ตามข้อ 1.2) นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและวัดค่าความเข้มข้น OD และนำมาเจือจางด้วย TE buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม จากนั้นทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน คือ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวกเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 µM gene specific primer (forward), 0.4 µM gene specific primer (reverse) ปรับ

ปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre – Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 60°C 30 วินาที, Extension 70°C 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ นำผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ตรวจวิเคราะห์ผล ด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

6. การทดสอบการแสดงออกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP

ทำการขยายเพิ่มปริมาณยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP และยาสูบปกติให้มีปริมาณมากพอที่จะทำการทดสอบโดย sub culture บนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA 5 μM + sucrose 3% (w/v) + agar 6.5% (w/v) pH 5.7 นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นนำมาทดสอบการแสดงออกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ดังนี้

6.1 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะเค็ม (NaCl)

สำหรับชนิดเกลือของดินเค็มในพื้นที่ปลูกพืชของประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (เพิ่มพูน, 2527) ดังนั้นจึงได้ใช้เกลือ NaCl เป็นตัวทดสอบ โดยนำต้นอ่อนยาสูบปกติ และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 μM + sucrose 3% (w/v) + agar 6.5% (w/v) pH 5.7 และเกลือ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (w/v) ทำการชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของต้นยาสูบที่ทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 7 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ ประกอบด้วย

ปัจจัย A ชนิดพืช คือ ยาสูบปกติ (Non – GM) และยาสูบที่มียีน CyP (GM)

ปัจจัย B ความเข้มข้นของ NaCl ที่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (w/v)

<u>การบันทึกผล</u>

1. อัตราการเจริญเติบโตคิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น คำนวณจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น หลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด (เท่า)} = \frac{\text{น้ำหนักสดหลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

2. อัตราการรอดชีวิต เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) ที่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (w/v) นาน 6 สัปดาห์ โดยคิดค่าเฉลี่ยความเข้มข้นละ 10 ต้น

6.2 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ โดยใช้ polyethylene glycol (PEG 6000)

สาร PEG จัดเป็นสาร osmoticum ชนิดหนึ่ง เมื่อใช้ในปริมาณมากจะทำให้ osmotic potential ลดลง และทำให้พืชเกิดสภาวะขาดน้ำ จึงนิยมนำมาใช้ในการทดสอบความทนทานต่อการขาดน้ำในพืช ทำการทดสอบ โดยนำต้นอ่อนของยาสูบปกติ และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 μM + sucrose 3% (w/v) + agar 8% (w/v) pH 5.7 และ PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 5, 10, 15 และ 20% (w/v) ทำการชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของต้นยาสูบที่ทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ ประกอบด้วย

ปัจจัย A ชนิดพืช คือ ยาสูบปกติ (Non – GM) และยาสูบที่มียีน CyP (GM)

ปัจจัย B ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 0, 5, 10, 15 และ 20% (w/v)

การบันทึกผล : อัตราการเจริญเติบโตคิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น คำนวณจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น หลังเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด (เท่า)} = \frac{\text{น้ำหนักสดหลังเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

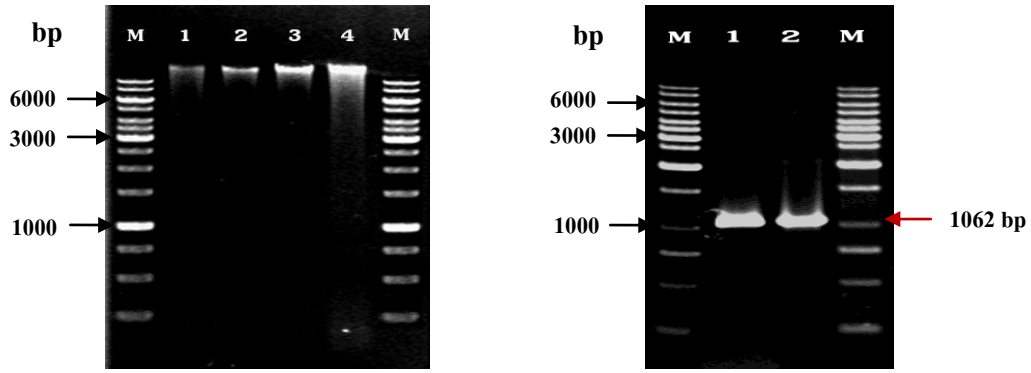
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีน CyP จากข้าวฟ่าง

สังเคราะห์ยีน CyP ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากข้าวฟ่าง โดยการทำปฏิกิริยา PCR (Figure 1a.) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (Figure 1b.) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบยีนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1062 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน CyP ได้จำนวน 172 amino acid อยู่ภายใน Open reading frame (ORF) ระหว่างตำแหน่งของลำดับดับเบสที่ 131 – 649 และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง polyadenylation signal AATAA motif อยู่ในส่วนของ 3'UTR ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติม พบว่า ยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวฟ่างมีความเหมือนอย่างสูงกับตำแหน่ง Trp128 (W128) ของยีน CyP ทั้งหมดที่พบในยูคาริโอต (Liu *et al*., 1991) และลำดับกรดอะมิโน KSGKPLH ตำแหน่งที่ 48 – 54 จะมีความเฉพาะเจาะจงกับยีน CyP ในส่วนของ cytoplasmic ที่พบได้ในพืชหลายชนิด (Lippuner *et al*., 1994) (Figure 2.) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) (GQ246462.1) (Appendix 1.) และข้าวโพด (*Zea mays* L.) (X68678.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identity) เท่ากับ 91% และ 90% ตามลำดับ

Table 1. Primer name, Base sequence, Size of primer, Melting temperature (Tm) and GC content of designing specific primers from Genbank on http://www.ncbi.nim.nih.gov/.

Primer name	Base sequence (5' → 3')	Size (bp)	Tm (°C)	GC content (%)
CyP4(forward)	CCG GCT ATT TTA CCG CAC CMG TYC TC	26	67.7(60)	53.8
CyP4(reverse)	GGG CKA TCC ATG CTT GGC AGT TCA C	25	68.7(60)	58.0
CyP*Xba*I(forward)	CAC TCT AGA ATG GCG AAC CCG CGC GTC TTC TTC GAC	36	74.9(60)	58.3
CyP*Kpn*I(reverse)	CAC GGT ACC CTA GCT GAG CTG GCC GCA GTC AGC ATC	37	78.0(60)	64.9
NOS(forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT CGA GCT C	28	67.5(60)	50.0
35SCaMV(reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	70.1(60)	53.3
CyP*Sal*I(forward)	CAC GTC GAC ATG GCG AAC CCG CGC GTC TTC TTC GAC	36	77.2(60)	63.9
CyP*Hd*(reverse)	CAC AAG CTT CTA GCT GAG CTG GCC GCA GTC AGC GAT C	37	75.8(60)	59.5
T7_Up1(forward)	CGG CGT AGA GGA TCG AG	17	62.0(60)	64.7
T7_term(reverse)	CTA GTT ATT GCT CAG CGG	18	57.6(60)	50.0



a. **b.**

Figure 1 a. Genomic DNA isolated from two sorghum cultivars on 1% agarose gel. Lane M = 1 kb DNA ladder (Fermentas), lane 1-2 = Genomic DNA from sorghum (UT 1), lane 3-4 = Genomic DNA from sorghum (SPR 60).

b. PCR analysis of cyclophilin gene from 2 cultivars sorghum using specific primer CyP4 (forward) and CyP4 (reverse). Lane M = 1 kb DNA ladder (Fermentas), lane 1 = PCR product from sorghum (UT 1), lane 2 = PCR product from sorghum (SPR 60).

Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of cyclophilin gene. The start (ATG) and stop (TAG) codons are highlighted. The underline shows the polyadenylation signal AATAA, the red bold shows the conservative sequence of the plant cytoplasmic cyclophilin.

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL – EBI database (European Bioinformatics Institute, UK) (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU722309) พบว่า ยีน CyP ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน (Figure 3.) ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open Reading Frame : ORF) มีขนาด 519 คู่เบส, ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5’ ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5’ Untranslated region หรือ 5’UTR) มีขนาดเท่ากับ 130 คู่เบส และทางด้านปลาย 3’ ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3’ Untranslated region หรือ 3’UTR) มีขนาดเท่ากับ 143 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ยีน CyP ที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสมบูรณ์ จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ submit ลงในฐานข้อมูลของ GenBank accession no. EU722309. (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html) (Appendix 2.)

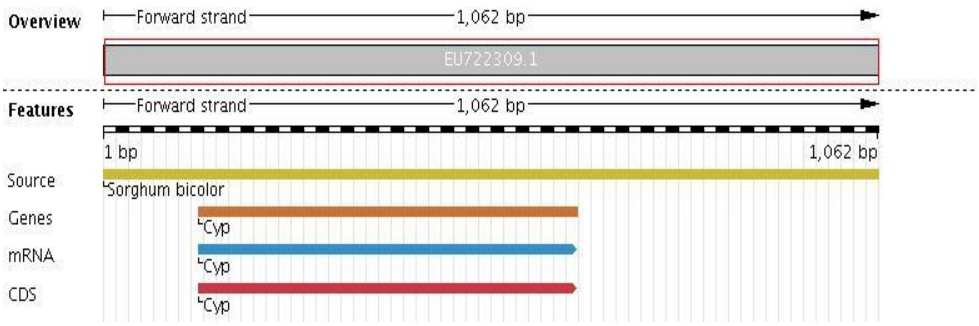


Figure 3. Structure of cyclophilin gene analyzed by EMBL-EBI database. The 1062 bp fragment of CyP gene is shown above (yellow bar). Coding sequence (CDS) of this gene is 519 bp (red arrow).

เมื่อนำข้อมูลยีน CyP จากข้าวฟ่างในส่วนที่มีการแสดงออกมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน CyP ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi) พบว่า ยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวฟ่างมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวฟ่าง (sorghum) (*Sorghum biocolor* (L.) Moench) อ้อย (sugarcane) (*Saccharum officinarum* L.) และข้าวโพด (corn) (*Zea mays* L.) (Figure 4.)

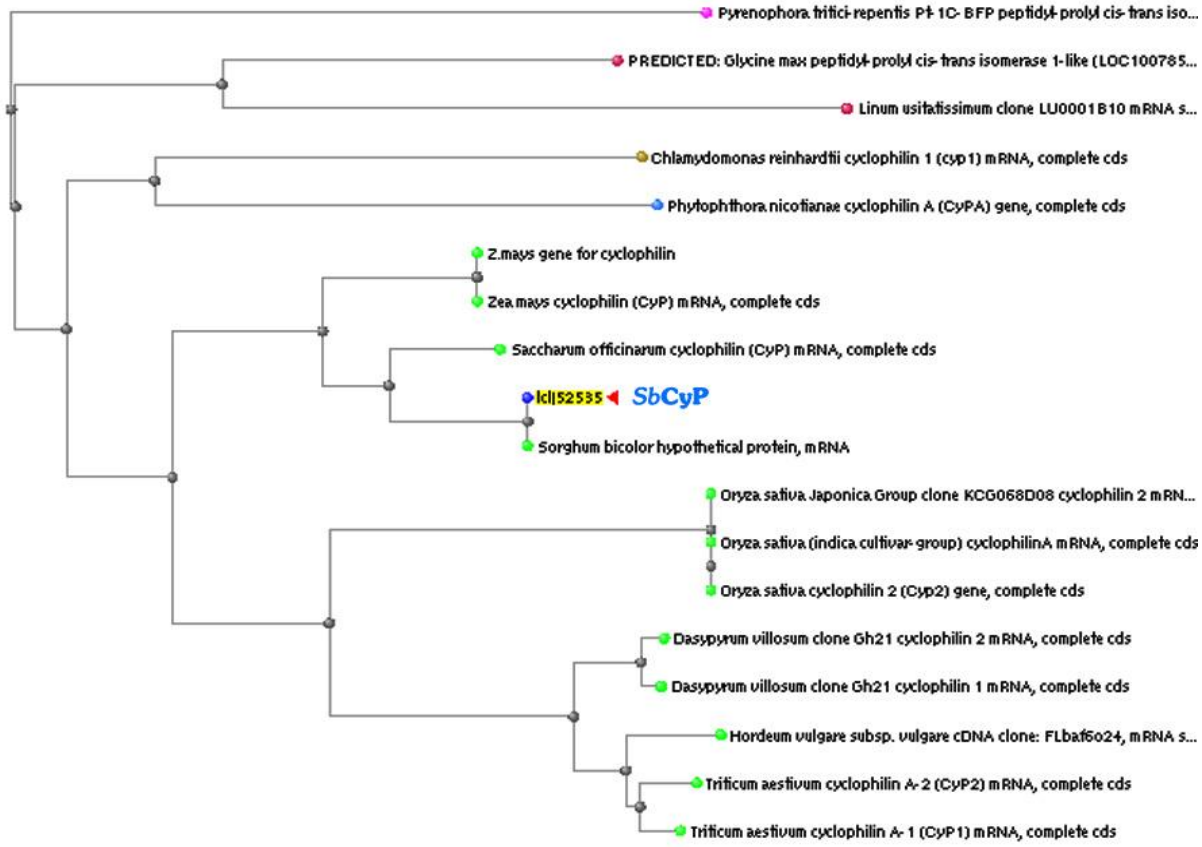
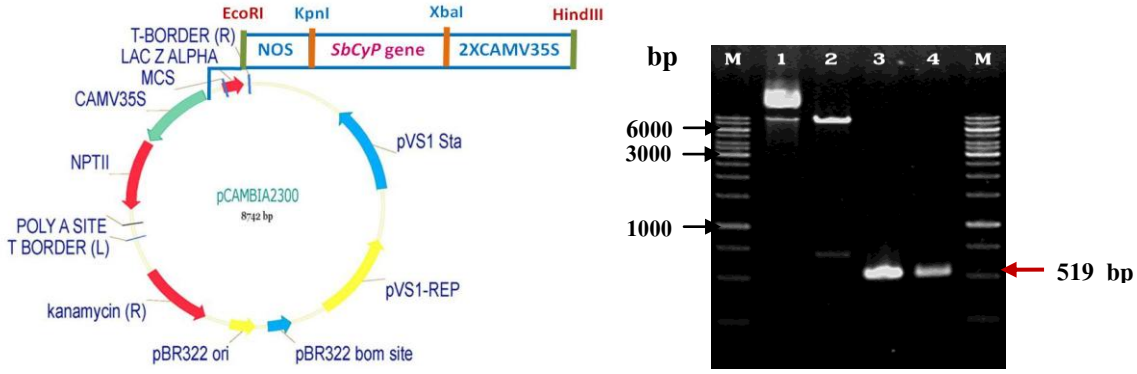


Figure 4. Phylogenetic tree of cyclophilin gene showing the relationship between the *Sorghum biocolor* (L.) Moench and different plant species.

2. การสร้างชุด Cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

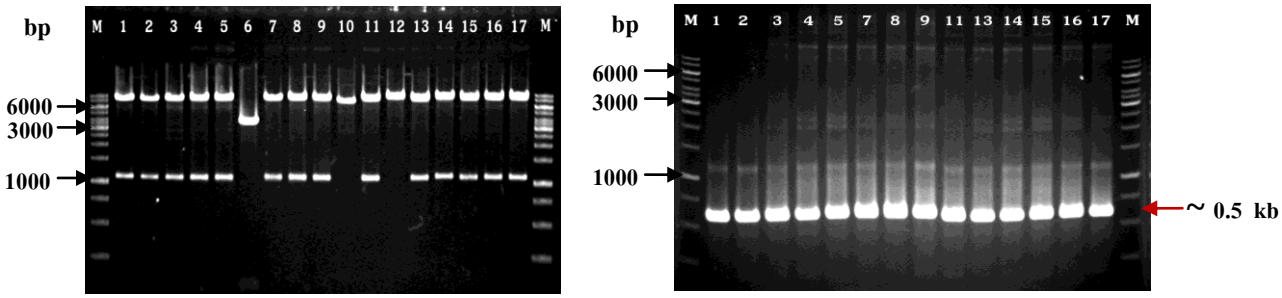
นำชิ้นยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 519 คู่เบส เชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) (Figure 5a.) ขนาดประมาณ 9640 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I (Figure 5b.) โดยที่ pCAMBIA2300 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin phosphotransferase (nptII) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ซึ่งมี 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกคือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Kpn*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 1 และ 9 กิโลเบส (Figure 6a.) และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส (Figure 6b.) โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – CyP) มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส (Figure 7.)



a. **b.**

Figure 5 a. Map of plant expression vector (pCAMBIA2300) and position of the cyclophilin (CyP) gene in plant expression vector.

b. DNA of a plant expression vector (pCAMBIA2300) and a cyclophilin (CyP) gene digested with specific enzyme *Xba*I and *Kpn*I. Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1 = Plasmid DNA of pCAMBIA2300, lane 2 = Plasmid DNA of pCAMBIA2300 digested with specific enzyme *Xba*I and *Kpn*I, Lane 3 = PCR product CyP gene, lane 4 = PCR product CyP gene digested with specific enzyme *Xba*I and *Kpn*I.



a. **b.**

Figure 6 a. Pattern of DNA derived from recombinant plasmid DNA (pCAMBIA2300 – CyP) digested with specific enzyme *Hind*III and *Kpn*I. Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), Lane 1-17 = pCAMBIA2300 – CyP clone 1 – 17

b. PCR analysis of plasmid DNA (pCAMBIA2300 – CyP) using specific primer NOS (forward) and 35SCaMV (reverse). Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1-14 = pCAMBIA2300 – CyP clone 1-5, 7-9, 11 และ 13-17

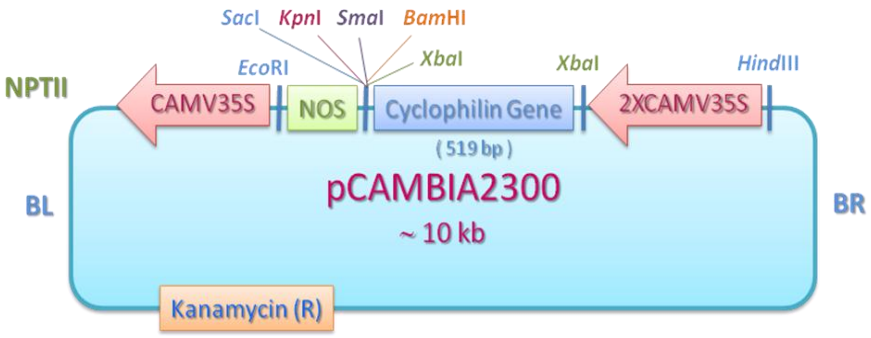


Figure 7. Structure of plasmid construct pCAMBIA2300 – CyP.

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน (protein expression)

นำชิ้นยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 519 คู่เบส เชื่อมต่อเข้ากับ protein expression vector (pEcoli – vector) (Figure 8a.) ขนาด 5758 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I และ *Hind*III (Figure 8b.) โดยที่ pEcoli – vector ซึ่งอยู่ในส่วนของ N – terminal vector ในระบบ T7 expression system มี T7 promoter เป็นส่วนประกอบ โปรตีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมา โดยเอนไซม์ T7 RNA polymerase จะเข้าไปจับกับ T7 promoter ทำให้เกิดการถอดรหัสและแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ ซึ่งแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) มียีนที่สามารถสร้าง T7 RNA polymerase ได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IPTG จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบรูปแบบของแถบ

ดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ คือ ขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบส (pEcoli vector) และ 0.5 กิโลเบส (CyP) (Figure 9a.) และการตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7_Up (forward) และ T7_term (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส (Figure 9b.) โดยโครงสร้างของ recombinant protein (pEcoli – CyP) ที่มีความสมบูรณ์จะมีขนาดประมาณ 6.3 กิโลเบส จากนั้นนำ recombinant protein (pEcoli – CyP) ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว นำไปถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยการตรวจสอบปริมาณของ fusion protein จากเซลล์ *E. coli* ที่มี recombinant protein (pEcoli – CyP) เมื่อทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์และชักนำยีนด้วย 3mM IPTG เป็นเวลานาน 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า ยีน CyP มีการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน ซึ่งมีขนาดประมาณ 18.4 kDa และพบว่าโปรตีนจะมีปริมาณสูงสุด หลังจากชักนำด้วย IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Figure 10.)

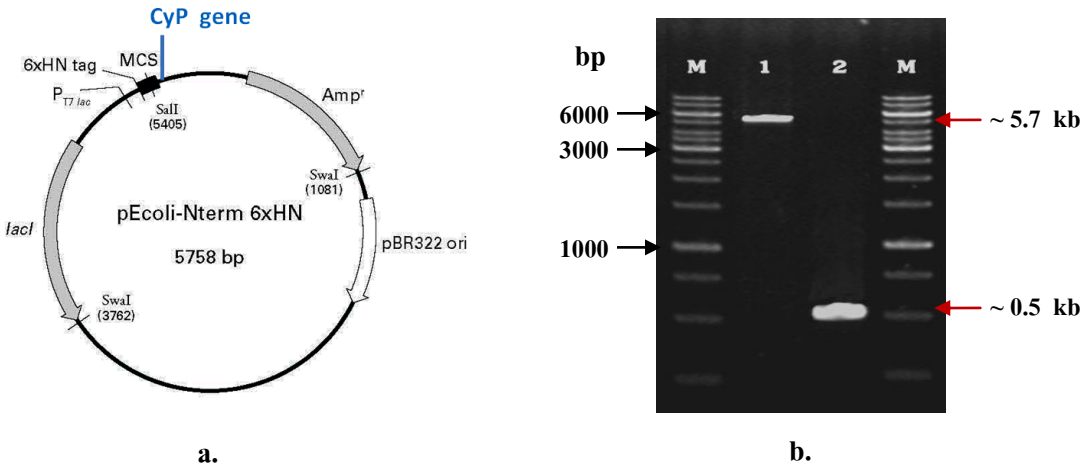


Figure 8 a. Map of protein expression vector (pEcoli) and position of the CyP gene in protein expression vector.

b. DNA of protein expression vector (pEcoli) and CyP gene digested with specific enzyme *Sal*I and *Hind*III. Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1 = Plasmid DNA of pEcoli vector digested with specific enzyme *Sal*I และ *Hind*III, Lane 2 = PCR product CyP gene, lane 3 = PCR product CyP gene digested with specific enzyme *Sal*I และ *Hind*III.

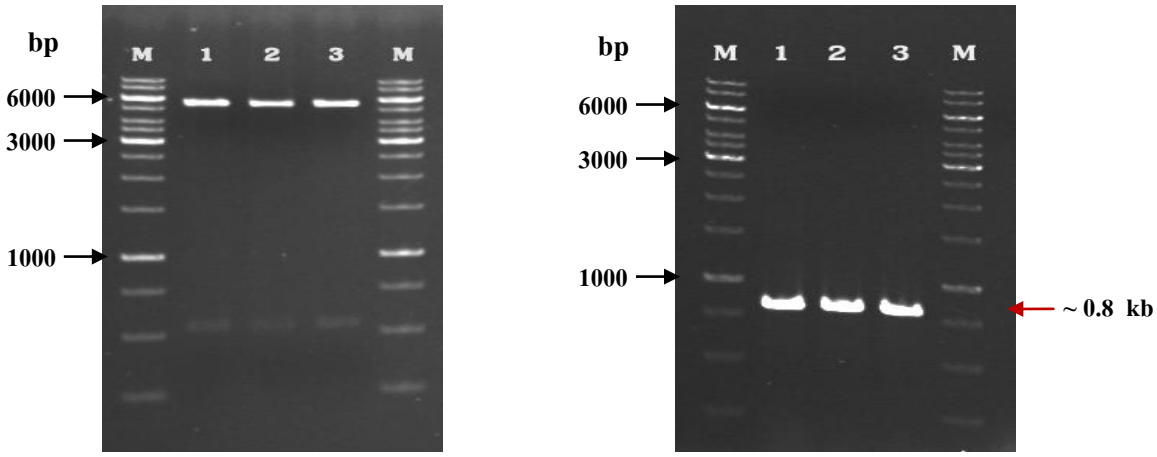


Figure 9 a. Pattern of DNA derived from recombinant protein (pEcoli – CyP) digested with specific enzyme *Sal*I and *Hind*III. Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), Lane 1-3 = pEcoli – CyP clone 1 – 3.

b. PCR analysis of plasmid DNA (pEcoli – CyP) using specific primer T7_Up (forward) and T7_term (reverse). Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1-3 = pEcoli – CyP clone 1-3**.**

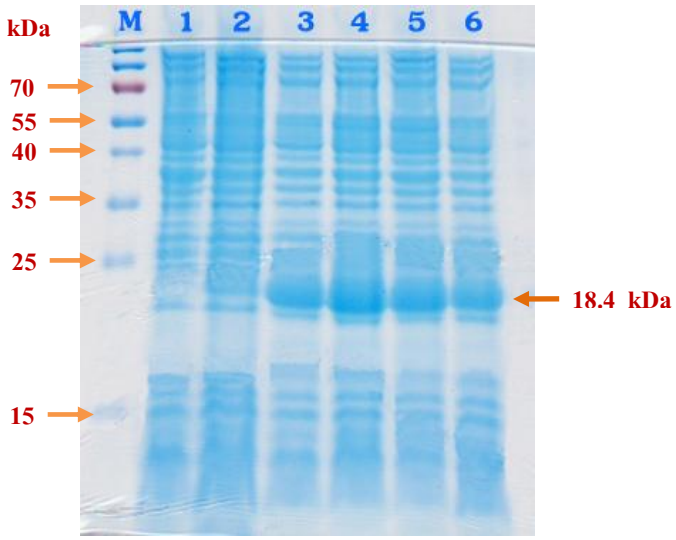


Figure 10. Expression of pEcoli - *Sb*CyP in *E. coli* BL21. M, protein marker; Lane 1 = BL21 without induction, Lane 2 = pEcoli - *Sb*CyP without induction; Lane 3 - 6 = pEcoli - *Sb*CyP induction for 2, 4, 6, and 8h respectively.

4. การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ และการคัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน

การถ่ายยีน CyP ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA2300 เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* (Linn.)) โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ภายหลังการถ่ายยีนต้องกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบออกจากพืชให้หมด โดยการใช้สารปฏิชีวนะชนิด carbenicillin 400 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งปริมาณที่ใช้มีความเหมาะสมสามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CyP บนอาหารคัดเลือก สูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 5 µM + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกยอดอ่อนที่รอดชีวิต ย้ายลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณยอด เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ทำการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ พบว่า ต้นยาสูบที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก MS – kanamycin มีจำนวน 25 ต้น โดยคัดเลือกจากยอดอ่อนที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปได้ (Figure 11a.) และต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก หรือเรียกว่า ต้น escape นั่นเอง (Figure 11b.) สารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมาย (selectable marker gene) ที่ใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยถ่ายฝากยีนเข้าไปในจีโนมพืชพร้อมกับยีนเป้าหมาย ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin จะไม่สามารถทำอันตรายแก่เนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับยีนจะตายในอาหารคัดเลือก (Miki and McHugh, 2004) งานวิจัยนี้พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีนสามารถพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยสามารถอยู่รอดบนอาหารคัดเลือก kanamycin ที่ความเข้มข้นในระดับค่อนข้างสูงคือ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากยีน CyP ที่อยู่ในพลาสมิดสายผสมที่มียีน nptII สอดแทรกอยู่ในจีโนมของยาสูบด้วย

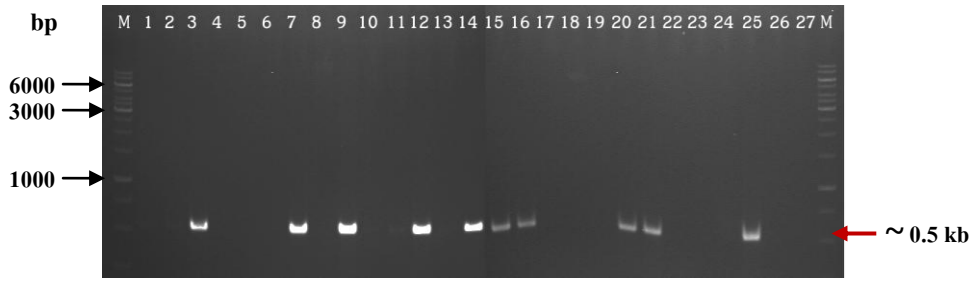
a. **b.**

Figure 11 **a.** Transformed tobacco plant containing cyclophilin gene cultured on MS media supplemented with 200 mg/l kanamycin

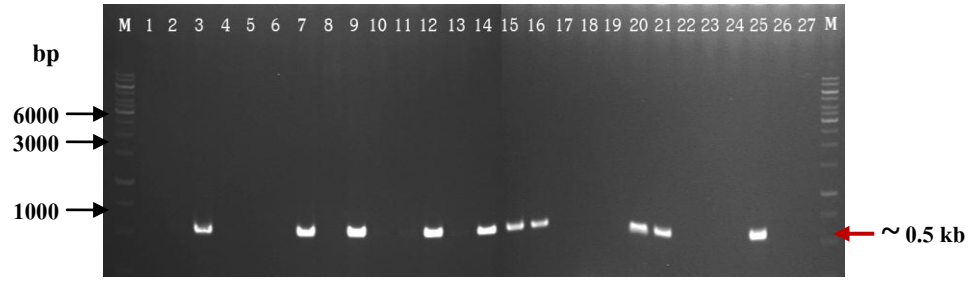
b. Non – transformed tobacco plant cultured on the same media as **a.**

5. การตรวจสอบการปรากฏของยีนในยาสูบ โดยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP จากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน คือ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวกเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า มีต้นยาสูบจำนวน 10 ต้น ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับยีนที่ได้สอดแทรกเข้าไปในจีโนมของยาสูบ ในขณะที่ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว (Figure 12a., b.)



a.



b.

Figure 12 a. PCR analysis of tobacco plant using specific primer CyP*Xba*I (forward) and CyP*Kpn*I (reverse).

b. PCR analysis of tobacco plant using specific primer NOS (forward) and 35sCaMV (reverse). Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1-2 = no. 1 – 2 control (no gene transfer had been performed), lane 3-27 = no. 3 – 27 (transgenic model plant).

6. การทดสอบการแสดงออกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP

6.1 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะเค็ม (NaCl)

จากการเพาะเลี้ยงยาสูบปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP ในอาหารที่มีส่วนประกอบของเกลือ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 3% เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยชนิดพืช ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มีอัตราการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดเท่ากับ 2.21 เท่า มากกว่ายาสูบปกติซึ่งมีเท่ากับ 1.64 เท่า และเมื่อพิจารณาปัจจัยความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของยาสูบปกติและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP แตกต่างกันทางสถิติโดยมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดสูงสุดในอาหาร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) 0.5% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) มากขึ้นอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดจะลดลง และเริ่มเห็นความแตกต่างของยาสูบทั้งสองชนิดอย่างเห็นได้ชัดที่ระดับความเข้มข้นเกลือ (NaCl) 2.0, 2.5 และ 3.0% ยาสูบทั้งสองชนิดมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลง โดยยาสูบที่มียีน CyP มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 1.97, 0.76 และ 0.73 เท่า ซึ่งมากกว่าอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของยาสูบปกติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.67, 0.34 และ 0.24 เท่า ตามลำดับ (Table 2.) และจากการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตทางสัณฐานวิทยา ยาสูบที่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% ถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลงเมื่อเทียบกับอาหารที่มีเกลือ (NaCl) ที่ระดับ 0 – 1% แต่ใบยังคงมีสีเขียว สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่ยาสูบปกติใบจะเหลืองซีด การตอบสนองต่ออาหารไม่ดี ขอบใบม้วน และมีบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 2.5 และ 3.0% (Figure 13.) เนื่องจากความเค็มมีผลกระทบต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของพืชในหลายๆ ลักษณะ และยังมีผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายวิภาคและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเดิมต่อไปอีก 2 สัปดาห์ จากข้อมูลเฉลี่ยอัตราการรอดชีวิตพบว่า ยาสูบทั้ง 2 ชนิด ยังคงมีอัตรารอดชีวิต 100% ที่ระดับเกลือ (NaCl) 1.5% เท่านั้น และจะค่อยๆ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) สูงขึ้น โดยยาสูบที่มียีน CyP มีอัตราการรอดชีวิต 80% และยาสูบปกติมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 30% เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) 2.0% และจะตายหมดเมื่อความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) เพิ่มขึ้นเป็น 2.5 และ 3.0% ในขณะที่ยาสูบที่มียีน CyP ยังคงรอดชีวิตถึง 50 และ 30% ตามลำดับ (Table 3.)

Table 2. Fresh weight increment (time) of non – transformed (non – GM) and transformed tobacco (GM) cultured on various concentrations of NaCl after 4 weeks of culture.

NaCl conc. (w/v) (A)	Fresh weight increment (time) (B)		A – Mean
	Non – GM	GM (CyP)	
0%	3.08	2.95	3.01 ab
0.5%	3.29	3.88	3.59 a
1.0%	2.30	2.56	2.43 b
1.5%	1.37	2.65	2.01 bc
2.0%	0.67	1.97	1.32 c
2.5%	0.34	0.76	0.55 d
3.0%	0.24	0.73	0.49 d
B – Mean	1.64	2.21	
% CV		**29.6**	

Means within the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level of DMRT

Table 3. Survival percentage of non – transformed (non – GM) and transformed tobacco (GM) cultured on various concentrations of NaCl after 6 weeks of culture.

NaCl conc. (w/v)	Survival percentage (%)	
	Non – GM	GM (CyP)
0%	100	100
0.5%	100	100
1.0%	100	100
1.5%	80	100
2.0%	30	80
2.5%	0	50
3.0%	0	30

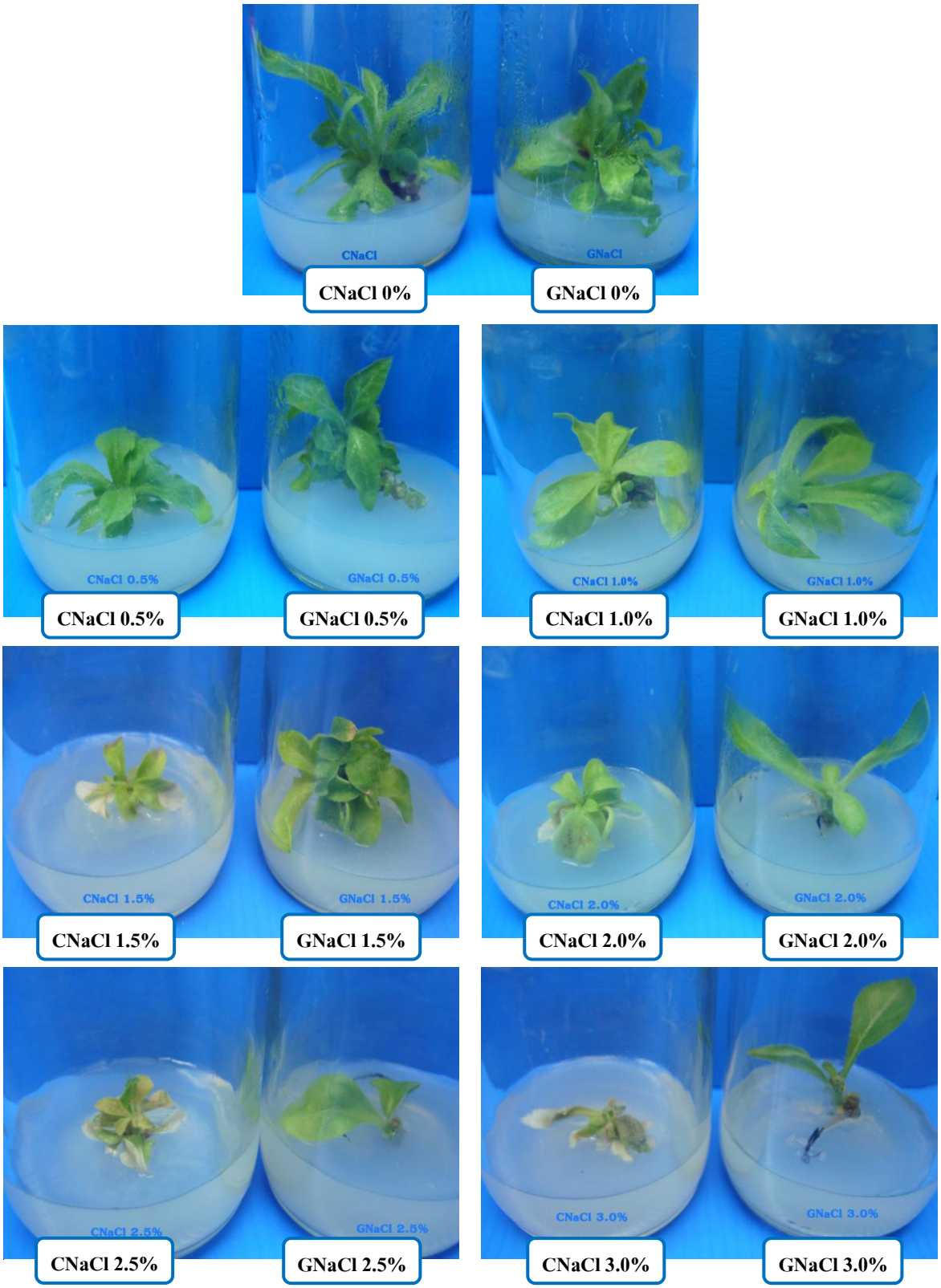


Figure 13. Growth of non – transformed tobacco (C) and transformed tobacco (G) on various concentration of NaCl (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0% (w/v)) after 4 weeks of culture.

6.2 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ (PEG 6000)

จากการเพาะเลี้ยงยาสูบปกติและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP ในอาหารที่มีส่วนประกอบของ PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20% เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยชนิดพืชคือ ยาสูบปกติ กับยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP พบว่ามีความแตกต่างกัน ในยาสูบปกติเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 5% จะมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดเท่ากับ 0.75 และ 0.60 เท่า และแตกต่างกันทางสถิติกับยาสูบปกติที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ที่ระดับ 10, 15 และ 20% ซึ่งมีการเพิ่มน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลงเท่ากับ 0.31, 0.33 และ 0.21 เท่าตามลำดับ ในขณะที่อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของยาสูบที่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 5, 10, 15 และ 20% มีค่าระหว่าง 0.71 – 0.86 เท่า โดยไม่ต่างกันทางสถิติในทุกระดับ และเมื่อพิจารณาจากปัจจัยความเข้มข้นของ PEG 6000 พบว่า ยาสูบที่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้นทุกระดับ จะมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดมากกว่ายาสูบปกติที่เลี้ยงบนอาหาร PEG 6000 ที่ความระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20% (Table 4.) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำของยาสูบที่มียีน CyP ซึ่งสามารถทนได้ถึงระดับความเข้มข้น 20% ในขณะที่ยาสูบปกติทนได้เพียงระดับความเข้มข้น 5% เท่านั้น

ส่วนการเจริญทางสัณฐานวิทยา รูปร่าง และสีใบ มีลักษณะที่สอดคล้องกับปริมาณน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น โดยยาสูบปกติไม่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น 10% ใบจะเริ่มเหลืองซีด และที่ระดับความเข้มข้น 15 – 20% จะแสดงให้เห็นถึงใบพืชที่มีลักษณะขาดน้ำอย่างเห็นได้ชัดคือ ปลายใบ และขอบใบจะม้วนตัว ซึ่งเป็นลักษณะการปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ สีของใบเหลืองซีด แห้งกรอบ ในขณะที่ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP ใบยังคงเขียว และสามารถเติบโตได้ตามปกติ (Figure 14.)

Table 4. Fresh weight increment (time) of non – transformed (non – GM) and transformed tobacco (GM) cultured on various concentrations of PEG 6000 after 3 weeks of culture.

PEG 6000 conc. (w/v) (A)	Fresh weight increment (time) (B)		A – Mean
	Non – GM	GM (CyP)	
0%	0.75a	0.71a	0.73
5%	0.60a	0.78a	0.69
10%	0.31b	0.77a	0.54
15%	0.33b	0.79a	0.56
20%	0.21b	0.86a	0.53
B – Mean	0.44	0.78	
% CV		**23.1**	

Means within the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level of DMRT

จากผลการทดลองดังกล่าว ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP สามารถทนทานต่อสภาวะเค็มของเกลือ (NaCl) ได้ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 และ 2.5% โดยยังคงมีอัตราการรอดชีวิต 50% ขึ้นไป และสามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ที่ระดับความเข้มข้น 15 – 20% ทั้งนี้ยีน CyP อาจมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ หรือโปรตีน ซึ่งทำให้พืชสามารถบรรเทาความเป็นพิษของเกลือ โดยการสร้างกลไกในลักษณะต่างๆ เช่น กลไกการหลีกเลี่ยง (avoidance mechanism) โดยหลีกเลี่ยงการสะสมเกลือในไซโตพลาสซึมจนถึงระดับที่เป็นพิษ หรือ สร้างระบบเอนไซม์ต่างๆ ที่มีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูง โดยการที่เอนไซม์บางชนิดยังคงมีกิจกรรมได้เป็นปกติ แม้จะได้รับอิทธิพลจากความเค็ม (ชาญวิทย์, 2537) หรือมีผลต่อการสร้างสารประกอบไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ มีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล เพื่อลดค่าชลศักย์ (osmotic potential) ภายในเซลล์ และทำให้เกิดการออสโมซิสของน้ำกลับเข้ามาในเซลล์ (reverse osmosis) ให้มากขึ้น เพื่อชะลอการไม่ให้แรงดันเต่งลดลง ทำให้เซลล์รักษาสภาพเอาไว้ได้ (ชุมพล, 2555) อย่างไรก็ตามในพืชแต่ละชนิดหรือพืชชนิดเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ จะมีการแสดงออกของยีนที่อยู่ในสภาพเครียดแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นจะต้องศึกษากลไกการทำงานของยีน CyP ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนนี้โดยละเอียดต่อไป

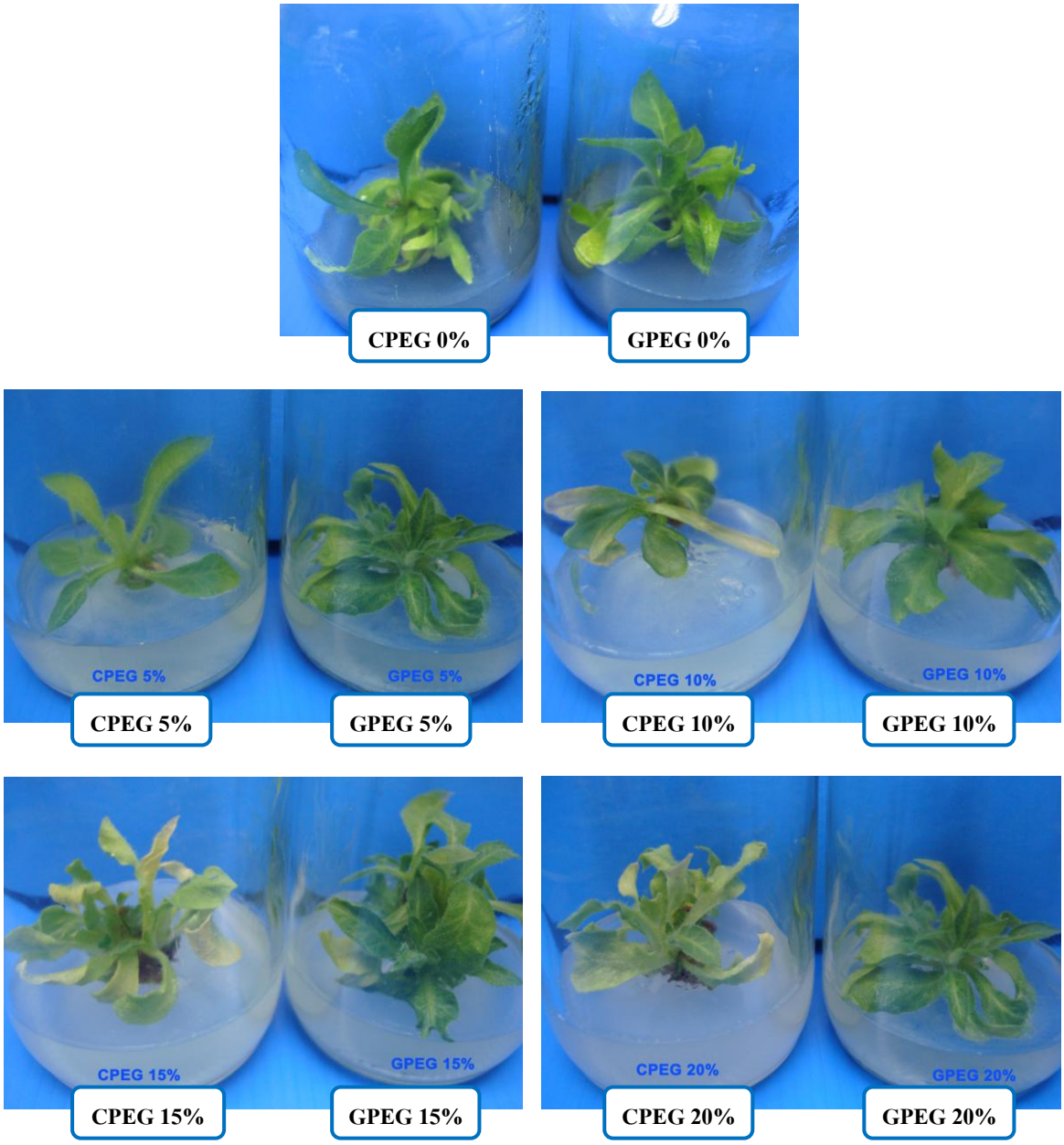


Figure 14. Growth of non – transformed tobacco (C) and transformed tobacco (G) on various concentration of PEG 6000 (0, 5, 10, 15 and 20% (w/v)) after 3 weeks of culture.

สรุปผลการทดลอง

การโคลนยีน CyP จากจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่างพันธุ์อู่ทอง 1 และสุพรรณบุรี 60 พบว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1062 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่า ยีนที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) จำนวน 519 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน CyP จำนวน 172 amino acid และยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อย และข้าวโพด โดยมีค่า % Max Identity เท่ากับ 91% และ 90% ตามลำดับ

การสร้างชุด Cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ได้พลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ pCAMBIA2300 – CyP มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส จำนวน 14 โคลน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน CyP ในระดับโปรตีน โดยการเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ขนาดของ fusion protein จากเซลล์ *E. coli* ที่มี recombinant protein (pEcoli – CyP) พบว่า ยีน CyP มีการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน และสังเคราะห์โปรตีนได้ปริมาณมากที่สุด เมื่อถูกชักนำด้วย 3mM IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 18.4 kDa

การถ่ายฝากชุดยีน pCAMBIA2300 – CyP เข้าสู่ใบยาสูบ โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สามารถคัดเลือกต้นยาสูบบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบต้นยาสูบที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปได้ จำนวน 25 ต้น

การตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ในยาสูบ โดยใช้เทคนิค PCR พบต้นยาสูบที่มียีน CyP ทั้งหมด 10 ต้น คิดเป็นประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ร้อยละ 40

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน CyP ในยาสูบ โดยการทดสอบความทนทานต่อสภาวะเครียด ได้แก่ ความทนเค็มและความทนสภาวะขาดน้ำ พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มีความทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้ดีกว่าต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน CyP ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ แสดงว่ายีน CyP ที่โคลนได้มีการแสดงออกในพืช

การนำไปใช้ประโยชน์ ได้นำชุดยีน CyP ไปถ่ายฝากเข้าสู่ถั่วเหลืองเพื่อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการชักนำแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์สำหรับนำไปปลูกคัดเลือกต่อไป นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาและโคลนยีนที่มีประโยชน์ในด้านอื่นๆ ได้สำเร็จ เช่น ยีน *Os*SKIPa ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมอีกยีนหนึ่ง และได้มีการนำยีน *Os*SKIPa ไปศึกษาการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ถั่วเหลืองเพื่อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อรองรับปัญหาอันเกิดจากสภาวะโลกร้อนได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวฟ่าง ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา และอนุเคราะห์ plant expression vector (pCAMBIA2300) สำหรับใช้ในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุทวัฒน์ สินธีรโรจน์ และ คุณขวัญจิต ชั้นปั้นแตง ผู้ช่วยนักวิจัย สำหรับความช่วยเหลืองานวิจัยด้านต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

จารุจินต์ นภีตะภัฏ, 2554. *เอลนินโญ/ลานินญา*. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=86&i2=6. 12 ธันวาคม 2554.

เพิ่มพูน กีรติกสิกร. 2527. ดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์: มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 250 น.

ชาญวิทย์ ม่วงมิตร. 2537. การชักนำให้เกิดพันธุ์อ้อยทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 69 น.

ชุมพล คุณวาสี. 2555. เอกสารประกอบการสอนวิชา 2303 107 General Biology ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.sc.chula.ac.th/botany/eClass/2303107/response49.pdf. 27 ธันวาคม 2556.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554. *ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร*. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/main.php?filename=agri_production. 12 ธันวาคม 2554.

BioLabs, 1993. Instruction Manual : Protein Fusion & Purification System ; Expression and Purification of Protein from Cloned Genes. Mississauga, Ontario, L4V118, Canada. 37 p.

Gasser, C.S., D.A. Gunning, K.A. Budelier and S.M. Brown. 1990. Structure and expression of cytosolic cyclophilin peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of higher-plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 9519 – 9523.

Godoy, A.V., A.S. Lazzaro, C.A. Casalongue and B. San Segundo. 2000. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Sci*. 152: 123 – 124.

Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227 : 1229 – 1231.

Kong, H.Y., S.C. Lee and B.K. Hwang. 2001. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. *Physiol Mol Plant Pathol*. 59: 189 – 199.

Lippuner, V., I.T. Chou, S.V. Scott, W.F. Ettinger, S.M. Theg and C.S. Gasser.1994. Cloning and characterisation of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 269 : 7863–7868.

Liu, J., C.M. Chen and C.T. Walsh. 1991. Human and *Escherichia coli* cyclophilins: Sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry*. 30 : 2306–2310.

Luan, S., M.W. Albers and S.L. Schreiber. 1994. Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher-plant. *Proc Natl Acad Sci*. 91: 984 – 988.

Marivet, J., P. Frendo and G. Burkard. 1992. Effects of abiotic stresses on cyclophilin gene-expression in maize and bean and sequence analysis of cyclophilin cDNA. *Plant Sci*. 84: 171-178.

Marivet, J., M. Margispinheiro, P. Frendo and G. Burkard. 1994. Bean cyclophilin gene-expression during plant development and stress conditions. *Plant Mol Biol*. 26: 1181-1189.

Marivet, J., P. Frendo and G. Burkard. 1995. DNA-sequence analysis of a cyclophilin gene from maize-developmental expression and regulation by salicylic acid. *Mol Gen Genet*. 247 : 222-228.

Miki, B and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. of Biology*. 107 : 193 – 232.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*. 15 : 473 – 497.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545 p.

Sharma, S.D. and P. Singh. 2003. Effect of water stress on expression of a 20 kD cyclophilin-like protein in drought susceptible and tolerant cultivars of Sorghum. *J. Plant Biochem Biot*. 12 : 77 – 80.

Walkerpeach, C. R. and J. Velten. 1994. Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems In: S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort (eds). *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. B1: 1-19.

Watad, A.A., D. Swartzberg, R.A. Bressan, S. Izaher and P.M. Hasegawa. 1991. Stability of salt tolerance at the cell level after regeneration of plants from a salt tolerant tobacco cell line. *Physiol. Plant*. 83: 307 – 313.

Saccharum officinarum cyclophilin (CyP) mRNA, complete cds
Sequence ID: gb|GQ246462.1|Length: 904 Number of Matches: 2
Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1050 bits(546)	0.0()	712/780(91%)	23/780(2%)	Plus/Plus	

Features:

```
Query 115  CTACCTTCGGATCCCGATGGCGAACCCGCGCGTCTTCTTCGACATGACGGTcggcggcgc  174
           ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 59   CTAGCTTCGGATCCCGATGGCGAACCCGCGCGTCTTCTTCGACATGACCGTCGGCGGCGC  118

Query 175  ggcggcggggcggATCGTGATGGAGCTGTACGCGAACGAGGTGCCCAAGACGGCCGAGAA  234
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 119  CCCGGCGGGGCGGATCGTGATGGAGCTGTACGCCAACGAGGTGCCCAAGACGGCCGAGAA  178

Query 235  CTTCCGCGCGCTGTGCACGGGCGAGAAGGGCGTGGGGAAGTCCGGGAAGCCGCTCCACTA  294
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||
Sbjct 179  CTTCCGCGCGCTGTGCACGGGCGAGAAGGGCGTGGGGAAATCGGGGAAGCCGCTCCACTA  238

Query 295  CAAGGGCTCCACCTTCCACCGCGTCATCCCGCAGTTCATGTGCCAGGGCGGCGACTTCAC  354
             ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 239  CAAGGGCTCCACCTTTCACCGCGTCATCCCGCAGTTCATGTGCCAGGGCGGCGACTTCAC  298

Query 355  CCGGGGCAACGGGACCGGAGGCGAGTCCATCTACGGCGACAAGTTCCCCGACGAGAAGTT  414
             ||| |||||||| || ||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct 299  CCGCGGCAACGGCACGGGAGGGGAGTCCATCTACGGCGAGAAGTTCCCCGACGAGAAGTT  358

Query 415  CGTGCGCAACCACACGGCCCCCGGGGGTGCTCTCCATGGCCAACGCCGGGGCCCAACACCAA  474
             |||||||| |||||||  |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct 359  CGTGCGCAAGCACACGGGGCCCGGGGGTGCTCTCCATGGCCAACGCGGGGCCCAACACCAA  418

Query 475  CGGCTCCCAGTTCTTCATCTGCACCGTCGATACCCCCTGGCTCGACGGCAAGCACGTCGT  534
             ||||||||||||||| |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 419  CGGCTCCCAGTTCTTCGTCTGCACCGTCGAGACCCCCTGGCTCGACGGCAAGCACGTCGT  478

Query 535  CTTTGGCCAGGTCGTCGAGGGCATGGACGTCGTCAAGGCCATCGAGAAGGTCGGATCCCG  594
             ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||||
Sbjct 479  CTTCGGCCAGGTCGTCGAGGGCATGGACGTCGTCAAGGCCATCGAGAAGGTGGGCTCCCG  538

Query 595  CAGCGGATCCACCTCCAAGGAGGTCAAGATCGCTGACTGCGGCCAGCTCAGCTAGATCGT  654
             ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 539  CAGCGGCTCCACCTCCAAGGAGGTCAAGGTCGCTGACTGCGGCCAGCTCAGCTAGATCTC  598

Query 655  TG--------GTCTGGTCTGCCCGTCCGCCCTCCCTCCCGTCATCGTCCACTCCGCCTGC  706
             ||         |||| ||||| ||| |||||||||  |||||||||| ||||||||||
Sbjct 599  TGGTCGTCTCGTCTCGTCTGTCCGGCCGCCCTCCCCTCCGTCATCGTCGACTCCGCCTGC  658

Query 707  GTCCCGTCCCGTTTCCGGTTTGCTTCGATCTGAATAAGATGATGGTGATCTGAGTGGTGG  766
             || ||||||| |||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 659  GT-CCGTCCCTTTTCC-ATTTGCTTCGATCTGAATAAGATGATGGTGATCTGAGTGGTGG  716

Query 767  TCTGAGTTGAGTCGTTTATTTATCATGTGCGTCTGTCTGTGTCGCTCGCGGTTTAATCTA  826
             |||| |||||||||| |   ||||||      ||| |||||||||| |||||||| ||
Sbjct 717  TCTGTGTTGAGTCGTTCA---ATCATG------TGTTTGTGTCGCTCGTGGTTTAATTTA  767

Query 827  GCGG----TGTAGGTGTGGATCTCCGAATCCCATGGCGCCTCTGCTTACTTCGTGTTTCA  882
             | ||    | ||||  ||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct 768  GAGGTTTATTTAGGCATGGATCTGCGAATCCCATGGCGCCTCTGCTTACTTCCTGTTTCA  827
```

Appendix 1. Comparison of the gene sequences Cyclophillin (CyP) clones of sorghum (*Soghum bicolor* (L.) Moench) with CyP gene sequencing of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) accession number GQ246462.1. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Sorghum bicolor cyclophilin (Cyp) gene, complete cds

GenBank: EU722309.1

Go to:

```
LOCUS       EU722309     1062 bp    DNA     linear   PLN 09-JUN-2008
DEFINITION  Sorghum bicolor cyclophilin (Cyp) gene, complete cds.
ACCESSION   EU722309
VERSION     EU722309.1  GI:189345345
KEYWORDS    .
SOURCE      Sorghum bicolor (sorghum)
  ORGANISM  Sorghum bicolor
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; PACMAD
            clade; Panicoideae; Andropogoneae; Sorghum.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1062)
  AUTHORS   Suphawadee,N., Payungsak,R., Karsedit,D., Chayanit,D. and
            Hathairat,U.
  TITLE     Cloning of a cyclophilin gene from Sorghum bicolor
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1062)
  AUTHORS   Suphawadee,N., Payungsak,R., Karsedit,D., Chayanit,D. and
            Hathairat,U.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (14-MAY-2008) Biotechnology Technology Research and
            Development Office, Department of Agriculture, Rangsit-Nakhonnayok
             Road, Thunyaburi, Pathumthani 12110, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1062
                     /organism="Sorghum bicolor"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:4558"
     gene            <131..>649
                     /gene="Cyp"
     mRNA           <131..>649
                     /gene="Cyp"
                     /product="cyclophilin"
     CDS             131..649
                     /gene="Cyp"
                     /note="peptidyl-propyl cis-trans isomerase"
                     /codon_start=1
                     /product="cyclophilin"
                     /protein_id="ACD93011.1"
                     /db_xref="GI:189345346"
                     /translation="MANPRVFFDMTVGGAAAGRIVMELYANEVPKTAENFRALCTGEK
                     GVGKSGKPLHYKGSTFHRVIPQFMCQGGDFTRGNGTGGESIYGDKFPDEKFVRNHTAP
                     GVLSMANAGPNTNGSQFFICTVDTPWLDGKHVVFGQVVEGMDVVKAIEKVGSRSGSTS
                     KEVKIADCGQLS"
ORIGIN
        1  tccggctatt ttaccgcacc agttctccct ccaccagatc agatcagatc acagaacgca
       61  acagccgaag gaaaaatttc cccccaacca aaaaccctct ctcccaaacc ctagctacct
      121  tcggatcccg atggcgaacc cgcgcgtctt cttcgacatg acggtcggcg gcgcggcggc
      181  ggggcggatc gtgatggagc tgtacgcgaa cgaggtgccc aagacggccg agaacttccg
      241  cgcgctgtgc acgggcgaga agggcgtggg gaagtccggg aagccgctcc actacaaggg
      301  ctccaccttc caccgcgtca tcccgcagtt catgtgccag ggcggcgact tcacccgggg
      361  caacgggacc ggaggcgagt ccatctacgg cgacaagttc cccgacgaga agttcgtgcg
      421  caaccacacg gcccccgggg tgctctccat ggccaacgcc gggcccaaca ccaacggctc
      481  ccagttcttc atctgcaccg tcgatacccc ctggctcgac ggcaagcacg tcgtctttgg
      541  ccaggtcgtc gagggcatgg acgtcgtcaa ggccatcgag aaggtcggat cccgcagcgg
      601  atccacctcc aaggaggtca agatcgctga ctgcggccag ctcagctaga tcgttggtct
      661  ggtctgcccg tccgccctcc ctcccgtcat cgtccactcc gcctgcgtcc cgtcccgttt
      721  ccggtttgct tcgatctgaa taagatgatg gtgatctgag tggtggtctg agttgagtcg
      781  tttatttatc atgtgcgtct gtctgtgtcg ctcgcggttt aatctagcgg tgtaggtgtg
      841  gatctccgaa tcccatggcg cctctgctta cttcgtgttt catcaccagt tatatgttat
      901  gagatccagg ataatgcatt aatgctatga gaactgagat tcggtttcat gcttcttgtt
      961  ccatgtgcca tgtcatgtgc gtcttgttcc attgcaagtt cggaccccaa aatgattttg
     1021  attgtcaata tgttaatgtg aactgccaag catggatcgc cc
```

Appendix 2. Sequence of the gene Cyclophillin (CyP) submit to the database of GenBank accession no. EU722309. (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html)